

Aldoxime dehydratase : crystal structure and catalytic mechanism involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis

著者	野村 純平
内容記述	Thesis (Ph. D. in Agricultural Science)--University of Tsukuba, (B), no. 2631, 2013.2.28 Includes bibliographical references (leaves 3-7)
発行年	2013
URL	http://hdl.handle.net/2241/120693

氏 名 (本籍)	野 村 純 平 (神奈川県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 2631 号
学位授与年月日	平成 25 年 2 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	Aldoxime Dehydratase: Crystal Structure and Catalytic Mechanism Involved in Carbon-Nitrogen Triple Bond Synthesis (アルドキシムデヒドラターゼ: 結晶構造および CN 三重結合形成の触媒機構)
主 査	筑波大学教授 農学博士 小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授 博士 (農学) 高 谷 直 樹
副 査	筑波大学准教授 博士 (農学) 中 村 顕
副 査	筑波大学准教授 博士 (工学) 橋 本 義 輝

論 文 の 内 容 の 要 旨

Pseudomonas chlororaphis B23 はかつてのアクリルアミド工業生産菌であり、現在も農薬の中間原料であるシアノバレリアミドの工業生産に使用されている。ニトリルを分解する本菌は、一方で、ニトリルを合成する酵素 Aliphatic aldoxime dehydratase (OxdA) を有し、本酵素がヘムを活性中心にもつことが明らかとなっている。最近、*Rhodococcus* sp. N-771 株がもつ (OxdA ホモログである) OxdRE の結晶構造が解析されたが、反応機構の詳細は依然として未解明なままであった。そこで、OxdA の結晶構造を決定し OxdRE と比較した上で、OxdA の変異体を構築し、その性質の詳細な解析を行うことを目的として、本研究は行われた。

まず、OxdA を結晶化させた後、X 線結晶構造解析に成功した。結晶構造情報を基に反応機構に関与する可能性のあるアミノ酸残基を対象にアラニンに変異させた各 OxdA 変異の発現プラスミドを構築し、発現後、各々精製することに成功した。各変異酵素と野生型 OxdA において CD スペクトル、ヘム含有量、活性を測定し解析した結果、触媒反応に必須のアミノ酸残基として、先行研究で既に明らかとなっている H320 の他に R178 と S219 の関与が示唆された。特に、S219A 変異体では完全に酵素活性が失われており、H320 と並び本酵素反応において最も重要なアミノ酸残基であると予想された。そのため、S219A 変異体のラマンスペクトル測定を詳細に行い、OxdA の環境にどのような変化が生じているかを詳細に調べた。その結果、OxdA の S219A 変異体 (CO) の Fe-CO 伸縮バンドは、WT (CO) よりも高振動数側にシフトしていることが分かった。このバンドの高振動数へのシフトは、S219A 変異体での CO 付近の環境が WT と比較してより親水的になったことを意味しており、S219A 変異体の活性が著しく低下していることから、本酵素では Ser の持つ OH 基の基質への相互作用が反応に重要であることを示唆している。S219 の水酸基から 4Å 以内に存在する極性アミノ酸を全て選択し、各々アラニンに置換した酵素を作成したが、(H320 を除く) 全ての変異体において酵素活性が著しく減少するものは存在しなかった。これらの結果は、S219 の求核性を増加させるアミノ酸がなく、S219 は基質に対して求核攻撃できないことを示唆している。また、活性部位を形成しているアミノ酸残基の間で、S219 と H320 だけがヘムに結合している基質を直接攻撃できるため、H320 は一般酸触媒としてだけでなく、一般塩基触媒としても働くアミノ酸であることが判明した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

Aliphatic aldoxime dehydratase (OxdA) は水溶液中での脱水反応を触媒し、(容易には作れない) CN 三重結合を形成する反応を触媒するユニークかつ希有な酵素である。活性中心であるヘムの配位子であるヒスチジン残基の存在は既に明らかであり、また、*Rhodococcus* sp. N-771 株の (OxdA ホモログである) OxdRE の結晶構造から、本来困難な水溶液中での脱水反応を、疎水的なヘムポケット環境が促進していることは示唆されたが、反応機構の詳細は未知であった。本研究によって、反応に関与する重要なアミノ酸残基 (S219) が同定されるとともに、一連の成果を基に提案された詳細な反応機構は従来知られているヘム酵素の機構とは全く異なる様式を示すことが明らかとなり、インパクトある研究として評価できる。さらに、ヘム環境構造と触媒機構に関する基礎的知見は今後、酵素のタンパク質工学的改良等を行う上で重要であり、最終的には本酵素を直接触媒として用いた有用物質 (ニトリル) 生産への応用が期待される。

平成 25 年 1 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。